

Priprava i imunomodulacijska svojstva modificiranih peptidoglikanskih fragmenata

KUI – 4/2013
Prispjelo 2. travnja, 2012.
Prihvaćeno 18. srpnja, 2012.

R. Ribić* i S. Tomić

Zavod za organsku kemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102a, HR-10 000 Zagreb

Imunomodulatori reguliraju imunološki odgovor. Imunostimulatori, poznati i kao adjuvanti, dodaju se cjepivima kako bi se ubrzala, produljila ili pojačala specifična imunoreakcija na određeni antigen. U potrazi za novim, učinkovitijim imunostimulatorima velik su potencijal pokazali derivati muramilpeptida. Muramilpeptidi su fragmenti peptidoglikana, prirodnih polimera koji izgrađuju stanične stijenke bakterija. Muramildipeptid (MDP), *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin, najmanja je strukturna jedinica peptidoglikana koja pokazuje imunostimulatornu aktivnost. Sastavni je dio i peptidoglikan monomera (PGM) izoliranog iz *Brevibacterium divaricatum*, koji je i sam učinkoviti adjuvant. Od brojnih poznatih derivata MDP-a posebno se ističu romurtid (MDP-Lys(L18)), koji je odobrila američka Uprava za hranu i lijekove (Food and Drug Administration, FDA) i mifamurtid (L-MTP-PE), koji je odobrila Europska agencija za lijekove (European Medicines Agency, EMA). S obzirom na to da *N*-acetilglukozamin u strukturi MDP-a nije ključan za njegov imunostimulacijski učinak, pripremljeni su desmuramildipeptidi s različitim acilnim skupinama na N-kraju L-Ala-D-isoGln. Tako su primjerice proučavani adamantilni desmuramildipeptidi kod kojih je na dipeptid vezana lipofilna adamantanska podjedinica. Dodatnim vezanjem manoze na imunološki aktivne tvari omogućuje se njihova interakcija s lektinima specifičnima za manozu kao što su na primjer manozni receptori (MR) eksprimirani na makrofazima i dendritičkim stanicama. Time se omogućuje ciljana dostava pripremljenog, manoziliranog imunomodulatora. Moguće posljedice takvih sintetskih transformacija pojačane su aktivnosti polaznih aktivnih spojeva kao i izravan utjecaj na smjer imunoreakcije. To je pokazano na primjerima manoziliranog MDP-a, PGM-a i adamantil-tripeptida.

Ključne riječi: *Imunomodulacija, muramildipeptid, peptidoglikan monomer, adamantilni desmuramildipeptidi, manoz*

Uvod

Imunološki odgovor moguće je regulirati imunomodulatorima. Dije se na imunosupresive i imunostimulatore. Imunostimulatori ili adjuvanti (lat. *adiuvare* – pomagati) utječu na produkciju citokina koji ubrzavaju, produžuju ili pojačavaju specifičnu imunoreakciju na određeni antigen. Na taj način omogućuju bolju obranu organizma protiv patogenih organizama i zbog toga se dodaju cjepivima koja nisu dovoljno imunogenična.^{1–3} Postoji mnogo različitih klasa spojeva koje pokazuju adjuvantsku aktivnost. Mogu se klasificirati na temelju nekoliko kriterija. U ovom prikazu obrađeni su peptidni adjuvanti, derivati muramildipeptida (MDP).²

Adjuvanti također mogu usmjeravati imunoreakciju prema pojedinom tipu, Th1 ili Th2. Tip imunoreakcije Th1 karakterizira stanični odgovor i tom tipu imunoreakcije svojstveno je uništavanje stanica na čijoj se površini nalaze peptidi patogena prezentirani preko MHC-molekula (engl. *major histocompatibility complex*) tipa I, a djelovanjem T-stanica. Kod odgovora Th2 aktiviraju se B-stanice koje luče antitijela karakteristična za humoralnu imunost.^{4,5} Za tip imunoreakcije Th1 karakteristična je proizvodnja citokina IL-2,

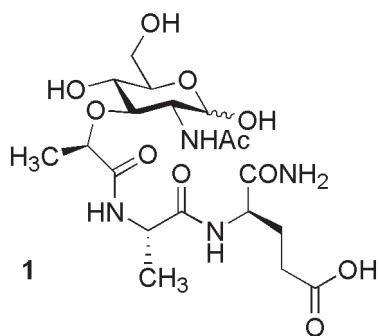
IL-12, IFN- γ i antitijela IgG2a i IgG2b, a za odgovor Th2 tipični su interleukini IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10 te antitijela IgG1.^{6,7} Stoga je smjer imunoreakcije moguće pratiti mjerenjem količine pojedinih limfokina ili količine podtipova antitijela IgG, IgG1 i IgG2a, odnosno njihova omjera. Primjerice, što je omjer IgG1/IgG2a manji, količina antitijela IgG2a je veća, odnosno imunoreakcija je više usmjerena prema tipu imunoreakcije Th1.

Muramildipeptid

Muramilpeptidi su integralni dijelovi peptidoglikana staničnih stijenki Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija. Peptidoglikani su prirodni polimeri građeni od alternirajućih molekula *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i *N*-acetilmuraminske kiseline (MurNAc) međusobno povezanih β -glikozidnom vezom, a umreženih preko kratkih peptida vezanih na MurNAc.¹ Muramildipeptid (MDP), *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin **1**, najmanja je strukturna jedinica peptidoglikana koja pokazuje adjuvantsku aktivnost (slika 1).

Mehanizam imunostimulacijskog djelovanja MDP-a i njegovih derivata nije do sada razjašnjen. Poznato je međutim da se polimerni peptidoglikani vežu na receptore *Toll-like* (TLR),^{8,9} a manji peptidoglikanski fragmenti na intracelular-

* Autor za dopisivanje: Dr. sc. Rosana Ribić
e-pošta: rribic@chem.pmf.hr



Slika 1 – Muramildipeptid (MDP)

Fig. 1 – Muramylidipeptide (MDP)

ne NOD-proteine.^{10,11} Primjerice, NOD1 specifično prepoznaje sekvenciju L-Ala-D-isoGln-mesoDAP, a receptor NOD2 fragment MurNAc-L-Ala-D-isoGln. To ukazuje da relativno male promjene u primarnoj peptidoglikskoj strukturi mogu biti važne za proces prepoznavanja koji vodi do imunoreakcije. Izmjene u primarnoj strukturi uzrokuju i promjene u konformaciji koje također mogu biti odgovorne za promjenu veznih sposobnosti, odnosno biološke aktivnosti molekule.¹

Sintetizirani su brojni derivati i analozi MDP-a kako bi se poboljšala imunostimulacijska aktivnost MDP-a te umanjile nuspojave koje izaziva, kao što su pirogenost, artritogenost i toksičnost. Modifikacije su rađene na MurNAc, L-Ala i D-isoGln dijelovima MDP-a. Istraživanjima se došlo do sljedećih zaključaka vezanih uz odnos strukture i aktivnosti.¹² Adjuvantska aktivnost MDP-a se ne umanjuje ako na šećernom dijelu nema anomerne hidroksilne skupine ili ukoliko se anomerna hidroksilna skupina zamijeni α - ili β -metilnom skupinom. Amidna skupina na položaju C-2 šećernog dijela je nužna, ali acetamid može biti zamijenjen i nekom drugom acilamido-skupinom. Također je moguća i izmjena N-acetilglukozamina nekim ugljikohidratnim konfiguracionim izomerom, kao što je primjerice manozni izomer.¹³ Spojevi ne gube aktivnost ako se primarna hidroksilna skupina na C-6 acilira ili zamijeni s amino- ili acilamino-skupinom. Lipofilni 6-O-acil-MDP-derivati **2** (L18-MDP; 6-O-stearoil-MDP) i **3** (B30-MDP; 6-O-(2-tetradecilheksadekanoil)-MDP) (slika 2) pokazali su se znatno boljim adjuvantima za specifičnu staničnu imunost od MDP-a (ali lošijim za humoralni odgovor).¹⁴

Modifikacijom D-laktinog dijela MurNAc pripremljeni su derivati **4** (nor-MDP) i **5** (3'-n-propil-MDP) (slika 2) koji se odlikuju manjom toksičnošću od MDP-a, a bez gubitka imunostimulatorne aktivnosti.¹⁵

Zamjena L-Ala D-alaninom rezultira inaktivnim spojem za razliku od zamjene nekom drugom L-aminokiselinom ili glicinom, pri čemu spojevi i nadalje pokazuju adjuvantsku aktivnost. Tako je npr. temurtid (MDP(Thr)) **6** (slika 2) netoksičan i osobito aktivan adjuvant za staničnu i humoralnu imunost, a dobiven je zamjenom L-Ala s L-treoninom.¹⁶

Kod glutaminskog dijela MDP-a bitno je da se zadrži D-konfiguracija na aminokiselini i da fragment od dva metilenska ugljikova atoma razdvaja karboksilne skupine, koje mogu biti slobodne ili supstituirane. Poznati su brojni deri-

vati s različitim supstituentima na karboksilnim skupinama. Dobrim kandidatom za primjenu pokazao su murabutid (MB) **7** (slika 2).¹⁷ Učinkovitiji je od MDP-a, ne izaziva nuspojave i primjenjiv je kod ljudi. Nadalje, konjugacija lipofilnih skupina preko γ -karbonila, izravno ili preko dodatne aminokiseline, dala je nekoliko učinkovitijih adjuvanata od MDP-a. U toj skupini derivata posebno se ističu romurtid (MDP-Lys(L18)) **8**, N^l-steraoil-MurNAc-L-Ala-D-isoGln-L-Lys,^{18,19} te muramiltripeptid fosfatidiletanolamin (MTP-PE) **9** koji je, kad je ugrađen u liposom, poznat pod imenom mifamurtid (L-MTP-PE).^{20,21} Romurtid **8** je imunostimulator odobren od američke Uprave za hranu i lijekove (FDA, engl. *Food and Drug Administration*). Mifamurtid je odobren od Europske agencije za lijekove (EMA, engl. *European Medicines Agency*) za liječenje nemetastaziranog osteosarkoma. Svojedobno su u kliničkim ispitivanjima bili i hidrofilni derivati nor-MDP **4**, temurtid **6** i murabutid **7**.

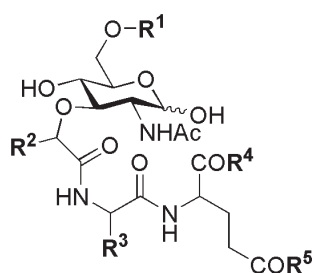
Peptidoglikan monomer

Peptidoglikan monomer **10** (PGM) je disaharid-pentapeptid (slika 3) sljedećeg sastava: β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-MurNAc-L-Ala-D-isoGln-mesoDAP(ϵ NH₂)-D-Ala-D-Ala. Predstavlja osnovnu ponavljajuću jedinicu stanične stijenke bakterije *Brevibacterium divaricatum*. Dobiven je lizozimskom hidrolizom neumreženih peptidoglikskih lanaca izoliranih iz bakterija tretiranih penicilinom.²²

Struktura PGM-a potvrđena je kemijskim i spektroskopskim metodama. Hidroksilna skupina na C1-atomu N-acetilmuraminskog prstena može biti u α - ili β -položaju te u anhidro-obliku. α -Anomer (63 %), β -anomer (32 %) te anhidro-oblik (5 %) PGM-a mogu se razdvojiti HPLC-om na koloni reverzne faze i detektirati kao zasebni signali.²³ U otopini pojedinačni izolirani oblik PGM-a izomerizira i ponovno nastaje ravnotežna smjesa triju izomera. Apirogen je i netoksičan spoj. Testovima *in vivo* i *in vitro* pokazano je da PGM pokazuje antitumorsku i antimetastatsku aktivnost^{24–26} te adjuvantsku aktivnost.^{27–31} Biološka aktivnost ograničena je razgradnjom PGM-a u uvjetima *in vivo*. N-Acetilmuramil-L-alanin-amidaza (peptidoglikska amidohidrolaza EC 3.5.1.28) iz ljudskog seruma razgrađuje PGM na disaharid i pentapeptid hidrolizom laktilamidne veze s L-alaninom (shema 1).³² Nedavno je izolirana i okarakterizirana L,(L/D)-aminopeptidaza,³³ enzim koji dodatno odcjepljuje L-Ala na N-kraju pentapeptida.

Modifikacijom amino-skupine na diaminopimelinskoj kiselini sintetizirani su lipofilni derivati PGM-a, *tert*-butiloksikarbonil-L-tirozil-PGM **11**³⁴ i (adamant-1-il)acetil-PGM **12**³⁵ (slika 4). *tert*-Butiloksikarbonil-L-tirozil-PGM (Boc-Tyr-PGM) je pripremljen reakcijom nezaštićenog PGM-a i aktivnog estera Boc-L-Tyr, a (adamant-1-il)acetil-PGM (AdCH₂CO-PGM) kondenzacijom PGM-a sa simetričnim anhidridom (adamant-1-il)octene kiseline. Povećanjem lipofilnosti želio se olakšati ulazak PGM-a u stanicu. Oba derivata PGM-a pokazala su adjuvantsku aktivnost sličnu kao i polazni PGM **10** u testovima *in vivo* u mišjem modelu.

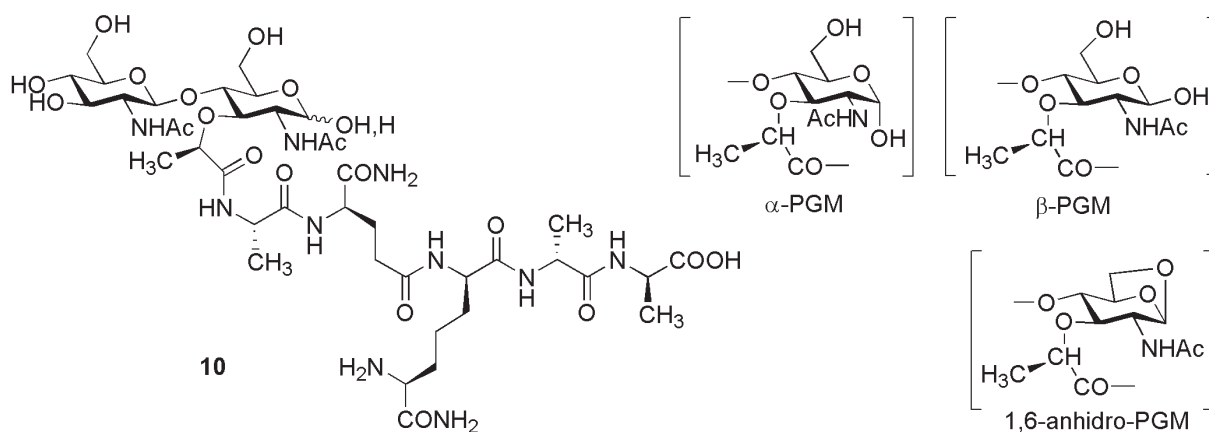
Konformacijskom strukturnom analizom spojeva **10**, **11** i **12** pokazalo se da uvođenjem lipofilnog supstituenta na terminalnu amino-skupinu aminokiseline DAP dolazi do konformacijskih promjena u peptidnom dijelu. Međutim terminalni dijelovi peptida nisu ključni pri vezanju molekule



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
MDP 1	H	CH ₃	CH ₃	NH ₂	OH
L18-MDP 2	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ CO	CH ₃	CH ₃	NH ₂	OH
B30-MDP 3	[CH ₃ (CH ₂) ₁₃] ₂ CO	CH ₃	CH ₃	NH ₂	OH
nor-MDP 4	H	H	CH ₃	NH ₂	OH
3'-propil-MDP 5	H	C ₃ H ₇	CH ₃	NH ₂	OH
MDP(Thr) 6	H	CH ₃	CH(CH ₃)OH	NH ₂	OH
MB 7	H	CH ₃	CH ₃	OC ₄ H ₉	NH ₂
MDP-Lys(L18) 8	H	CH ₃	CH ₃	NH ₂	NHCH(COOH)CH ₂ (CH ₂) ₃ NHCO(CH ₂) ₁₆ CH ₃
MTP-PE 9	H	CH ₃	CH ₃	NH ₂	NHCHCONH(CH ₂) ₂ OPO ₂ (OH)CH ₂ CHO ₂ C(CH ₂) ₁₄ CH ₃ <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%; margin-top: -10px;"> CH₃ OH CH₂O₂C(CH₂)₁₄CH₃ </div>

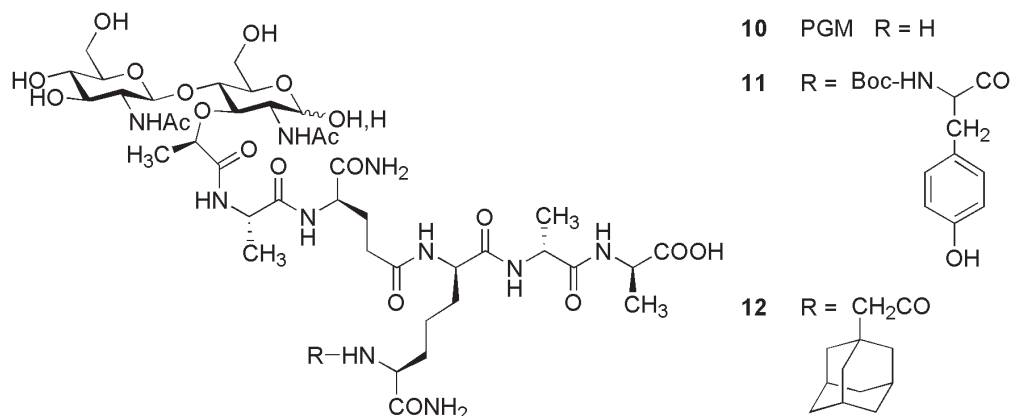
Slika 2 – Derivati muramildipeptida s adjuvantskom aktivnošću

Fig. 2 – Muramyl dipeptide derivatives with adjuvant activity



Slika 3 – Peptidoglikan monomer (PGM)

Fig. 3 – Peptidoglycan monomer (PGM)

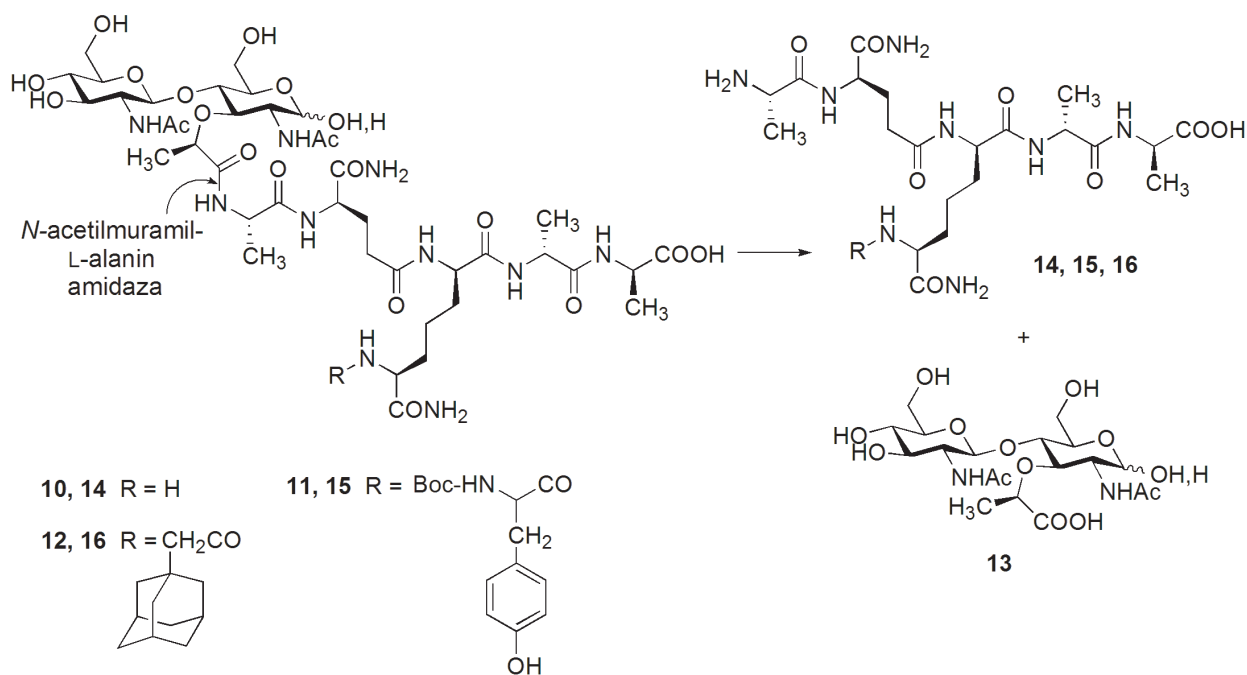
Slika 4 – Struktura tert-butiloksikarbonil-L-tirozil-PGM **11** i (adamant-1-il)acetil-PGM **12**Fig. 4 – Structures of tert-butylloxycarbonyl-L-tyrosyl-PGM **11** and (adamant-1-yl)acetyl-PGM **12**

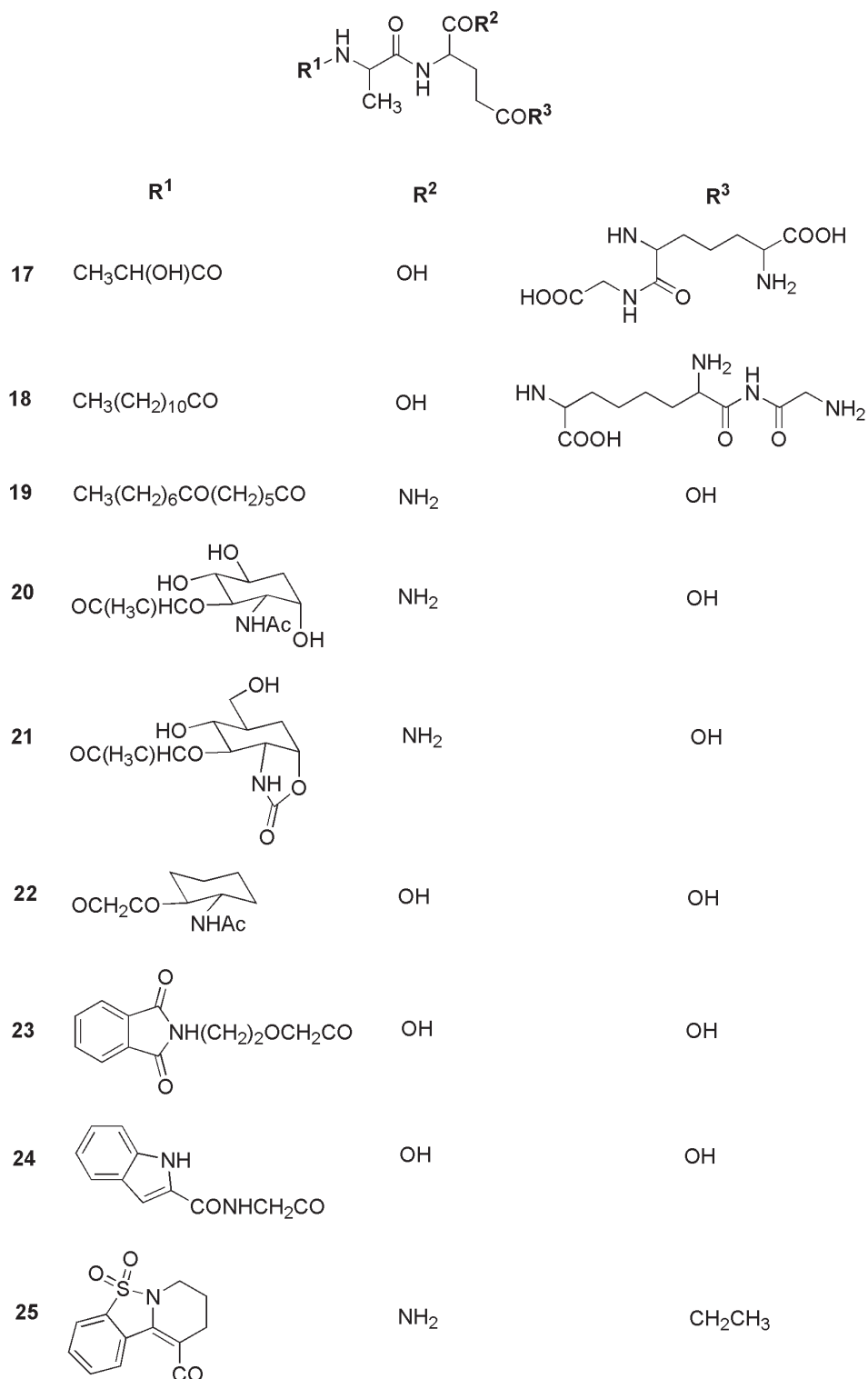
la na receptore ili enzime odgovorne za imunomodulacijsku aktivnost.³⁶

Kao i sam PGM **10**, tert-butiloksikarbonil-L-tirozil-PGM **11** i (adamant-1-il)acetil-PGM **12** pokazali su se dobrim supstratima za N-acetilmuramil-L-alanin-amidazu iz seruma sisavaca. Uvođenjem lipofilnog supstituenta nije došlo do promjene susceptibilnosti prema enzimu N-acetilmuramil-L-alanin-amidazi, koji derivate **11** i **12** hidrolizira na disaharid **13** i odgovarajući pentapeptid **15** ili **16** (shema 1).

Desmuramildipeptidi

Studije odnosa strukture i aktivnosti (SAR, engl. *structure-activity relationship*) pokazale su da N-acetil-D-glukozamin u strukturi MDP-a nije ključan za njegov imunostimulatorni učinak.¹² Stoga je u sintezi novih adjuvanata izvedenih iz MDP-a često primjenjivan pristup u kojem se šećerni dio modificira ili potpuno zamijeni acilnom skupinom.^{37,38} Tako su pripremljeni imunološki aktivni MDP-analozi bez N-acetilmuraminske kiseline, desmuramildipeptidni deri-

Shema 1 – Enzimska hidroliza PGM-a **10** i njegovih lipofilnih derivata **11** i **12** N-acetilmuramil-L-alanin-amidazomScheme 1 – Enzymatic hydrolysis of PGM **10** and its lipophilic derivatives **11** and **12** with N-acetylmuramyl-L-alanine amidase



Slika 5 – Desmuramildipeptidni derivati

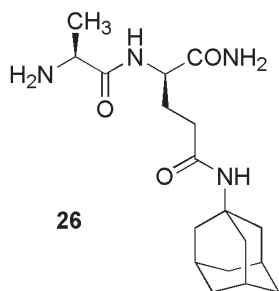
Fig. 5 – Desmuramylidipeptide derivatives

vati (slika 5), poput peptida FK-156 **17** koji je prethodno izoliran iz *Streptomyces olivaceogriseus*,³⁹ pimelautida **18**,⁴⁰ niza 7-(oksoacil)-L-alanil-D-izoglutamina od kojih je najaktivniji 7-(okso-tetradekanoil)-L-Ala-D-isoGln **19**,⁴¹ karbocikličkih analoga **20**, **21**⁴² **22**,⁴³ ftalimido derivata **23**,⁷ indolnog **24** i pirido-[1,2]-benzoizotiazolnog derivata **25**⁴⁴ te adamantilnih desmuramildipeptida.

Adamantilni desmuramildipeptidi

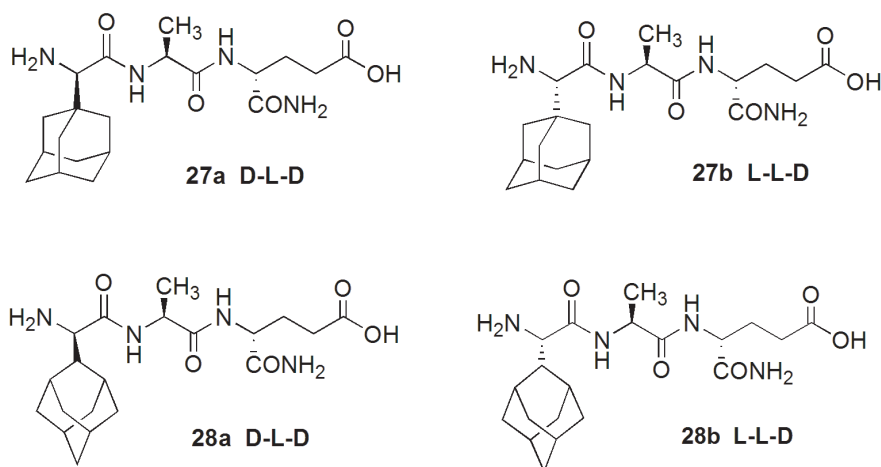
Literaturno je poznato nekoliko adamantil-desmuramildipeptida koji imaju vezanu lipofilnu adamantansku podjedinicu na L-Ala-D-isoGln iz muramildipeptida. Tako je adamantilamid-dipeptid (AdDP) **26** dobiven vezanjem 1-aminoadamantana na karboksilnu skupinu izoglutamina (slika 6).⁴⁵ Adamantilamid-dipeptid **26** pokazao se vrlo učinkovitim adjuvantom u eksperimentima *in vivo* u miševima i kunićima.⁴⁶ Pojačava humoralni odgovor na ovalbumin prilikom interperitonealne i oralne primjene. Imunoreakciju usmjerava prema tipu odgovora Th2.⁴⁷ Spoj **26** ugrađen u liposome djeluje i kao dobar stimulator nespecifične imunosti u mišjem modelu.⁴⁸

Vezanjem adamantana u obliku racemičnog adamantilglicina na amino-kraj dipeptida iz MDP (umjesto *N*-acetyl-



Slika 6 – Adamantilamid-dipeptid (AdDP)

Fig. 6 – Adamantylamide dipeptide (AdDP)



Slika 7 – Dijastereoizomeri (adamant-1-il)tripeptida i (adamant-2-il)tripeptida

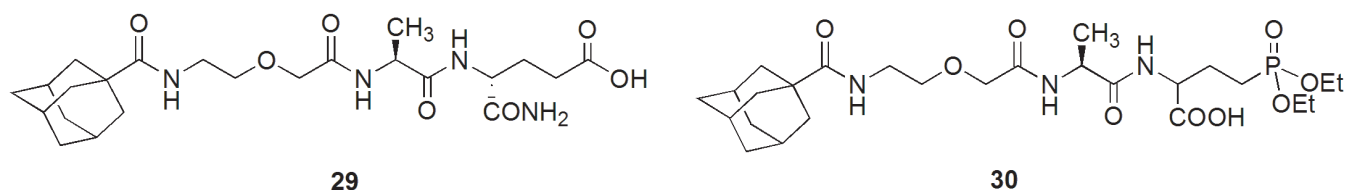
Fig. 7 – Diastereoisomers of (adamant-1-yl)tripeptide and (adamant-2-yl)tripeptide

muraminske kiseline) sintetizirani su apirogeni i netoksični diastereomeri adamantil-tripeptida (slika 7).^{49,50}

Adamantil-tripeptidi, D,L-adamantilglicil-L-alanil-D-izoglutamini **27** i **28**, priređeni su kondenzacijom racemičnog (adamant-1-il)glicina, odnosno (adamant-2-il)glicina s L-Ala-D-isoGln dipeptidom. U oba slučaja, čisti diastereomeri **27a** i **27b**, odnosno **28a** i **28b**, uspješno su odvojeni iz dobivene smjese izomera. Apsolutna konfiguracija diastereomera potvrđena je enzimskom oksidacijom njihovih hidrolizata, djelovanjem L-aminokiselinskom oksidazom.⁴⁹⁻⁵¹

Adamantil-tripeptidima ispitan je imunomodulacijski učinak na imunološki odgovor na ovalbumin kao antigen u miševima, a u usporedbi prema PGM-u.^{50,52} Svi izomeri adamantil-tripeptida pokazali su slabiju adjuvantnu aktivnost od peptidoglikan monomera **10**. Međutim uočena je razlika u djelovanju s obzirom na slijedove D-L-D i L-L-D. U dva genski različita mišja soja, NIH/OlaHsd(H-2^q) i CBA(H-2^k), izražen je isti trend djelovanja izomera (adamant-1-il)tripeptida **27a** i **27b**. (Adamant-1-il)tripeptid **27a** bolje stimulira proizvodnju antitijela IgG od diastereizomera **27b**. Kod (adamant-2-il)tripeptida dolazi do promjene trenda djelovanja, ovisno o genskom soju miševa. U miševima CBA(H-2^k) izomer (adamant-2-il)tripeptida **28b** pokazao se statistički značajnijim imunostimulatorom od **28a**, dok je u miševima NIH/OlaHsd(H-2^q) to bio izomer **28a**. Izomeri adamantil-tripeptida u oba mišja soja ne usmjeravaju imunoreakciju prema tipu Th1 ili Th2 značajnije od skupine koja je bila imunizirana samo antigenom OVA. (Adamant-2-il)tripeptidima dokazano je i antivirusno djelovanje na virus gripe tipa A. U provedenom testu *in vitro* osobito aktivnim pokazao se **28a** koji je na soj H1N1 djelovao jednako dobro kao i komercijalno dostupan lijek Symmetrel® (amantadin).⁴⁹

Supstitucijom *N*-acetilmuraminske kiseline iz MDP-a s (adamant-1-il)karboksiamido skupinom sintetizirani su adamantil-desmuramildipeptidi **29** i **30** (slika 8). Kod spoja **30** je izoglutamin dodatno zamijenjen fosfo-analogom, 2-amino-4-(dietoksifosforil)butanskom kiselinom.



Slika 8 – Desmuramylpeptidi s (adamant-1-il)karboksiamido-skupinom

Fig. 8 – Desmuramylpeptides with (adamant-1-yl)carboxyamido group

Navedenim desmuramylpeptidima **29** i **30** imunostimulativna aktivnost određena je testovima *in vitro* na čovječjim PBMC-kulturama (engl. *peripheral blood mononuclear cell*) tretiranim ionomicinom i PMA (engl. *phorbol 12-myristate 13-acetate*), uz MDP kao standard. Pokazalo se da fosfo-analog **30** uzrokuje veću proizvodnju IL-2, IL-4 i IL-10 od MDP-a i spoja **29**, čime je dokazano da dietil-fosfonatna podjedinica ima stimulatorni učinak na proizvodnju citokina.⁵²

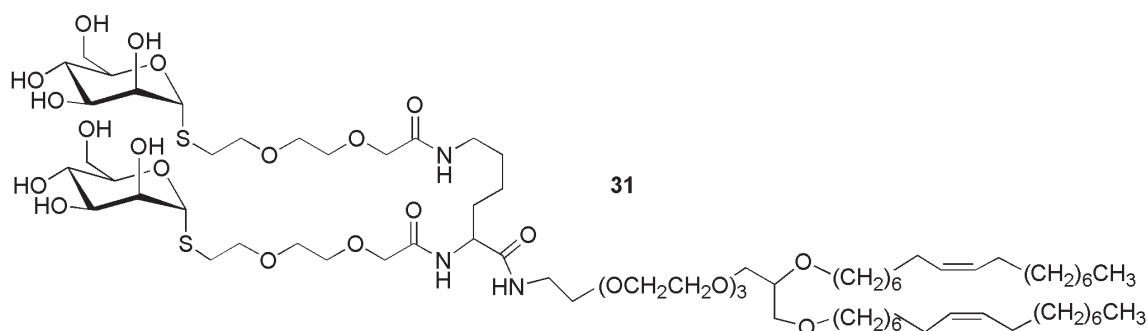
Manozni receptori

Lektini (lat. *legere* – izabrati) su proteini koji specifično i reverzibilno vežu šećerne strukture (monosaharide i oligosaharide), a ne pokazuju katalitičku aktivnost. Od stotine prirodnih monosaharida lektini prepoznaju samo njih nekoliko; D-manozu, D-glukozu, D-galaktozu, N-acetil-D-glukozamin, N-acetil-D-galaktozamin, L-fukozu, N-acetilneuraminsku kiselinu i D-ksilozu te oligosaharide koji sadrže navedene monosaharide. Dijele se na 5 osnovnih skupina s obzirom na šećer prema kojem pokazuju najveći afinitet, lektini koji su specifični za manozu, galaktozu i N-acetilgalaktozamin, N-acetilglukozamin, fukozu i N-acetilneuraminsku kiselinu. Aktivni dio lektina koji veže šećer naziva se CRD (engl. *carbohydrate-recognition domain*). Na temelju aminokiselinskog slijeda CRD-a i ostalih biokemijskih svojstava, lektini se mogu podijeliti na četiri velike skupine: tip C, tip S, tip P i tip I lektina. Lektini tipa C čine najveću skupinu i zajedničko im je da im je potreban ion Ca^{2+} u procesu vezanja ugljikohidrata.⁵³ U skupini C-tipa lektina nalaze se lektin MBL (engl. *mannose-binding lectin*), poznat i kao MBP (engl. *mannose-binding protein*), i manozni receptor (MR). MBP-i su rasprostranjeni u ljudskom serumu i imaju funkciju obrane domaćina od patogenih

organizama. MBP veže patogene preko C-kraja polipeptidnog lanca, a preko N-kraja se veže na makrofage, te tako omogućava fagocitozu, odnosno aktivaciju urođenog imunološkog sustava.^{53,54} Manozni receptori (MR) se nalaze na površini endotelnih stanica te na makrofazima i imaju ulogu u urođenoj imunosti. MR-i (uz ostale receptore) su smješteni i na dendritičkim stanicama koje prezentiraju antigen T-stanicama imunološkog sustava, nakon čega slijedi humoralni odgovor (posredovan specifičnim antitijelima) ili stanični imunološki odgovor (posredovan citotoksičnim T-stanicama).^{4,5} MR-i se smatraju receptorima za prepoznavanje patogena (PRR, engl. *pathogen recognition receptors*) koji prepoznaju komponente PAMP (engl. *pathogen associated molecular patterns*) na mikroorganizmima. Posreduju endocitozi i fagocitozi te otpuštanju citokina kojima se utječe na stečenu imunost, odnosno predstavljaju vezu između urođene i stečene imunosti.

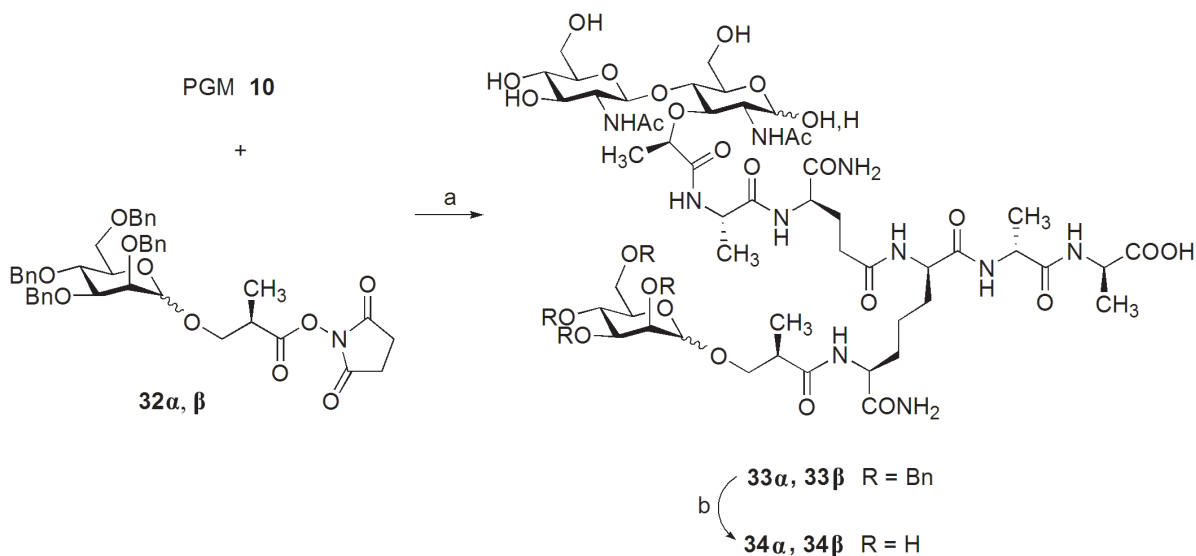
Konjugati manoze i muramildipeptida

Testovi *in vitro* pokazali su da MDP inhibira rast tumora aktivacijom makrofaga, koji zatim uništavaju tumorske stanice. S obzirom na to da slobodan MDP nije dovoljno dobar aktivator makrofaga, pripremljen je neoglikoproteinski nosač MDP-a kod kojeg je MDP kovalentno vezan na manozilirani serumski albumin (Man-BSA) jer na površini makrofaga postoji receptor za manozu.⁵⁵ Pokazalo se da uz dodatak i male količine navedenog MDP-Man-BSA-glikokonjugata značajno poraste aktivnost makrofaga.⁵⁶ Osim glikokonjugata, kao potencijalnih nosača MDP-imunomodulatora, upotrebljavaju se i manozilirani liposomi u koje je ugrađen MDP, a za koje se pokazalo da učinkovito inhibiraju metastaze na jetri. Manozni glikokonjugati se općenito mogu upotrebljavati za pripremu manoziliranih liposoma



Slika 9 – Manozilirani lipid upotrijebljen za pripremu manoziliranih liposoma

Fig. 9 – Mannosylated lipid used for the preparation of mannosylated liposomes



S h e m a 2 – Sinteza manoziliranih derivata PGM-a; (a) Et_3N , suhi DMF; (b) H_2 , Pd na ugljiku ($w(\text{Pd}) = 10\%$), $w(\text{EtOH}) = 50\%$

S c h e m e 2 – Synthesis of mannosylated derivatives of PGM; (a) Et_3N , dry DMF; (b) H_2 , Pd on carbon ($w(\text{Pd}) = 10\%$), $w(\text{EtOH}) = 50\%$

kao potencijalnih nosača za dostavu antigena.⁵⁷ Proučavanjem interakcija manoziliranih liposoma s lektinima koji specifično vežu manozu, kao što je konkavalin A, dokazalo se da su takvi liposomi potencijalni nosači lijekova, gena ili antigena do ciljanih stanica koje imaju ekspimirane manozne receptore na svojoj površini. Ista grupa autora pokazala je nedavno da se manozilirani liposomi, izgrađeni iz diantenarnih manoziliranih lipida **31** (slika 9), specifično vežu i na ljudske dendritičke stanice. Navedene manozilirane liposome s ugrađenim adjuvantom konjugirali su s antigenima i zatim im ispitali antitumorsko djelovanje *in vivo* u mišjem modelu. Pripravljene konstrukcije pokazale su se učinkovitima i potencijalnim sustavima za antitumorska cjepiva.^{58,59}

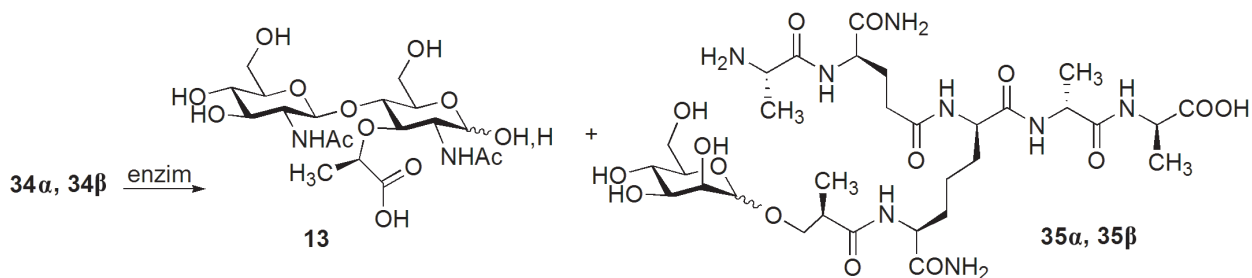
Manozilirani derivati peptidoglikan monomera

Manozilirani derivati PGM-a, $\text{Man-OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CO-PGM}$, pripremljeni su reakcijom nezaštićenog PGM-a **10** sa suviškom *N*-hidroksisukcinimidih estera **32α** ili **32β** (shema 2).⁶⁰ Tijekom reakcije ne nastaju nusprodukti zbog preferi-

rane konformacije PGM-a u vodenoj otopini i DMSO-u u kojoj je *meso*-diaminopimelinska kiselina (DAP) eksponirana i najdostupnija za reakciju.^{34,35}

$\text{Man-OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CO-PGM}$ derivati **34α** i **34β** dobiveni su uklanjanjem benzilne zaštite s manozne podjedinice konjugata **33α** i **33β**. Okarakterizirani su kemijskim i spektroskopskim metodama. U kromatogramima RP-HPLC dobivena su tri signala koja odgovaraju α - i β -anomernoj konfiguraciji i anhidro-formi peptidoglikanskog dijela molekule.²³ Derivati **34α** i **34β** podvrgnuti su enzimskoj hidrolizi s *N*-acetilmuramil-L-alanin amidazom (shema 3).

Do enzimске hidrolize **34α** i **34β** dolazi na istom mjestu kao kod samog PGM-a³² i njegovih lipofilnih derivata **11**³⁴ i **12**³⁵, tj. regioselektivno se cijepa laktamidna veza. Manozna ne utječe na susceptibilnost laktamidne veze prema enzimskoj hidrolizi, pa je hidroliza regiospecifična. Hidrolizira se samo laktamidna veza, a ne i amidna veza između amino-skupine *meso*-DAP i kiralne poveznice vezane na manozu, unatoč strukturnoj sličnosti tih regija. Naime, *N*-acetilmuraminska kiselina i *O*-(*D*-manopiranoziloksi)-2-metilpropanska kiselina imaju asimetričan ugljikov atom C2 apsolutne konfiguracije *R*.



S h e m a 3 – Produkti enzimске hidrolize $\text{Man-OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CO-PGM}$, *N*-acetilmuramil-L-alanin-amidazom

S c h e m e 3 – Products of the enzymatic hydrolysis of $\text{Man-OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CO-PGM}$ with *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase

Dijastereoizomeri **34 α** i **34 β** prvi su derivati PGM-a koji imaju ugljikohidratnu komponentu vezanu na DAP i prvi manozni derivati peptidoglikanskog fragmenta niske molekulske mase uopće.

Adjuvantska aktivnost Man-OCH₂CH(CH₃)CO-PGM **34 α** i **34 β** određena je na temelju njihova imunostimulatornog efekta na sekundarni humoralni imunološki odgovor na ovalbumin (antigen) u NIH/OlaHsd(H-2^a) mišu. Man-OCH₂CH(CH₃)CO-PGM **34 α** ne povećava proizvodnju ukupnih antitijela anti-OVA IgG, a **34 β** uzrokuje čak smanjenje količine antitijela (imunosupresivno djelovanje). Dakle, manozilirani derivati peptidoglikan monomera ne pokazuju adjuvantsku aktivnost, odnosno ne pojačavaju humoralni imunološki odgovor. Međutim analizom podtipova antitijela IgG, IgG1 i IgG2a pokazalo se da dolazi do promjene smjera imunoreakcije prema tipu odgovora Th2.

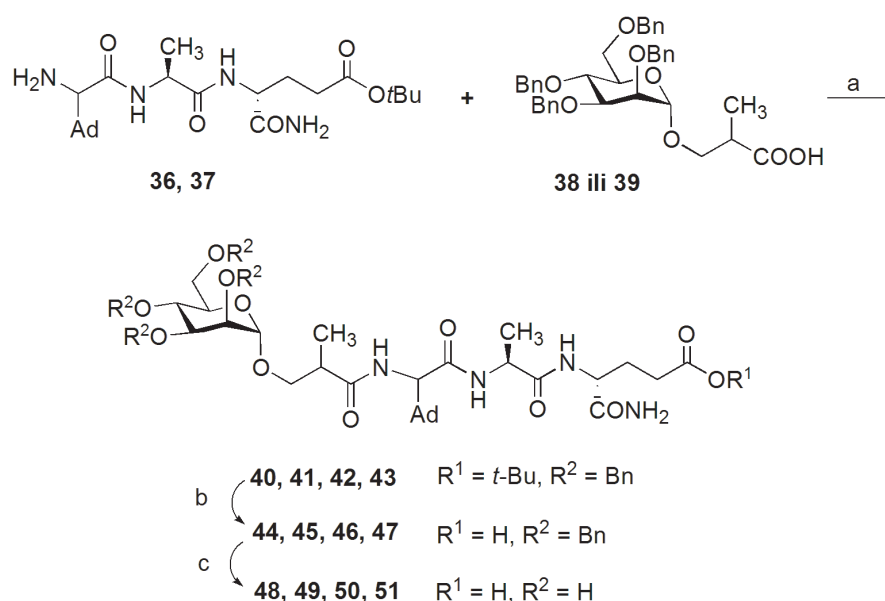
Na temelju navedenog može se zaključiti da vezanjem manoze dolazi do smanjenja adjuvantske aktivnosti PGM-a. Mogući razlog tome je što uvođenjem hidrofilnog supstituenta dolazi do velike promjene tercijarne strukture, odnosno konformacije, zbog čega je otežano vezanje molekula na receptore važne za vezanje PGM-a. S obzirom da su oba dijastereoizomera dobri supstrati za enzim *N*-acetilmuramil-L-alanin-amidazu, može se očekivati da do promjene dolazi u peptidnom dijelu udaljenijem od laktamidne veze koja se hidrolizira. S druge strane, moguće je da je došlo do vezanja na manozne receptore, što je uzrokovalo otpuštanje drugačijih citokina od onih koji se otpuštaju prilikom vezanja na NOD-receptore. Naime, poznata su istraživanja u kojima je vezanje na manozne receptore rezultiralo slabijom imunoreakcijom.^{61,62} Međutim za sad nema konkretnih dokaza da su manozni receptori uključeni u mehanizam djelovanja polaznog PGM-a i njegovih manoziliranih derivata.

Manozilirani adamantilglicil-desmuramilpeptidi

(Adamant-1-il)tripeptidi **36** i (adamant-2-il)tripeptidi **37** modificirani su α -manozom analogno modifikaciji PGM-a i to tako da je na terminalnu amino-skupinu tripeptida vezana (2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-manopiranoziloksi)-2-metilpropionska kiselina, (*R*)- **38** ili (*S*)- **39** u odnosu na asimetrični ugljikov atom poveznice (shema 4).⁶³

Kiselom hidrolizom dobivenih *tert*-butilnih estera **40-43** pripremljeni su glikopeptidi **44-47**. U toj fazi pokušano je odvajanje dobivenih dijastereoizomera. Odvajanje dobivenih izomera bilo je uspješno samo kod glikopeptida **44** kojeg je na (adamant-1-il)tripeptid manozna vezana preko poveznice (*R*)-konfiguracije. Kod ostalih glikopeptida **45-47** navedena metoda odvajanja izomera nije dala rezultat, pa se kod navedenih spojeva u sljedeći korak išlo sa smjesom dijastereoizomera. Katalitičkim hidrogeniranjem benzilima zaštićenih glikokonjugata **44-47** dobiveni su konačni produkti **48-51** sljedećih strukturnih formula: **48a** (α -Man-(*R*)-OCH₂CH(CH₃)CO-D-(Ad-1-il)Gly-L-Ala-D-isoGln), **48b** (α -Man-(*R*)-OCH₂CH(CH₃)CO-L-(Ad-1-il)Gly-L-Ala-D-isoGln), **49** (α -Man-(*S*)-OCH₂CH(CH₃)CO-D,L-(Ad-1-il)Gly-L-Ala-D-isoGln), **50** (α -Man-(*R*)-OCH₂CH(CH₃)CO-D,L-(Ad-2-il)Gly-L-Ala-D-isoGln) i **51** (α -Man-(*S*)-OCH₂CH(CH₃)CO-D,L-(Ad-2-il)Gly-L-Ala-D-isoGln).

Ispitan je utjecaj manoze na adjuvantsku aktivnost adamantil-tripeptida u dva genetska soja miša. Imunomodulacijska aktivnost manoziliranih adamantil-tripeptida **48-51** određena je u miševima CBA(H-2^k) u usporedbi s polaznim tripeptidima **27** i **28** te PGM-om **10**. Općenito, svi testirani spojevi slabije induciraju proizvodnju ukupnih antitijela IgG od PGM-a, odnosno djeluju kao slabiji adjuvanti od PGM-a.

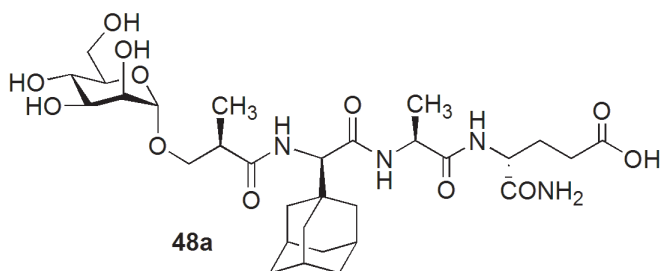


S h e m a 4 – Sinteza manoziliranih adamantil-tripeptida; a) EDC · HCl, HOBT · H₂O, Et₃N, V(dioksan) : V(CH₂Cl₂) = 1 : 1; b) TFA; c) H₂, Pd na ugljiku (w(Pd) = 10 %), w(EtOH) = 50 %

S c h e m e 4 – Synthesis of mannosylated adamantyltripeptides; a) EDC · HCl, HOBT · H₂O, Et₃N, V(dioxan) : V(CH₂Cl₂) = 1 : 1; b) TFA; c) H₂, Pd on carbon (w(Pd) = 10 %), w(EtOH) = 50 %,

Kako je kod spoja **50** i **51** različita apsolutna konfiguracija na poveznici između manoze i (adamant-2-il)tripeptida, te jednak omjer diastereoizomera (izomeri s obzirom na aminokiselinski slijed u peptidnom dijelu), ispitan je utjecaj apsolutne konfiguracije *R* (kod spoja **50**) i *S* (kod spoja **51**) na imunostimulacijsku aktivnost. Manoziliran (adamant-2-il)tripeptid **50** uzrokuje proizvodnju veće količine ukupnih antitijela IgG od izomera **51**, što znači da je za stimulaciju imunološkog odgovora poželjna apsolutna konfiguracija *R* na poveznici. Nadalje, usporedbom aktivnosti izomera **27a** i njegovog manoziliranog derivata **48a** kod kojeg je poveznica konfiguracije *R* (slika 10) uočeno je da se manoziliranjem pojačava njegova aktivnost u usporedbi s polaznim tripeptidom. Dakle, manozilacijom adamantil-tripeptida preko poveznice konfiguracije *R* povećava se imunostimulacijska aktivnost polaznog tripeptida.

U miševima NIH/OlaHsd (H-2^q) testirana je imunomodulacijska aktivnost manoziliranog (adamant-1-il)tripeptida **48a** u usporedbi s PGM-om **10** i (adamant-1-il)tripeptidom **27a**. Ovim pokusom također je potvrđeno da se vezanjem manoze preko poveznice apsolutne konfiguracije *R* na izomer **27a** pojačava njegova imunomodulacijska aktivnost. Ujedno, glikopeptid **48a** pokazao je jednako dobar imunostimulacijski učinak na proizvodnju ukupnih antitijela IgG kao i PGM koji je učinkovit adjuvant.



Slika 10 – Najučinkovitiji manozilirani (adamant-1-il)tripeptid
Fig. 10 – The most effective mannosylated (adamant-1-yl)tripeptide

Navedeni rezultati ukazuju da manozina ima važnu ulogu u stimulaciji imunološkog odgovora. Također je potrebno naglasiti da je **48a** stabilan, apirogen, netoksičan i u vodi topljiv spoj, što ga čini potencijalno primjenjivim adjuvanom u cjepivima. Iz omjera antitijela anti-OVA IgG1 i anti-OVA IgG2a uočeno je da PGM **10** i (adamant-1-il)tripeptid **27b** imaju tendenciju usmjerenja imunoreakcije prema tipu Th2, a manozilirani tripeptid **48a** više prema tipu Th1 (iako usmjerenje nije statistički značajno).⁶⁴

Također je pokazano da se manozilirani (adamant-2-il)tripeptidi ugrađuju u liposome, pri čemu adamantanska podjedinica ulazi u lipidni dvosloj, a manozina se nalazi na površini liposoma. To je dokazano dodatkom konkavalina A (ConA), lektina specifičnog za manozu.⁶⁵ Analogni rezultati dobiveni su u ugradnjom manoziliranog 1-aminoadamantana⁶⁶ u liposome. Ugradnja adamantanske podjedinice u lipidni dvosloj uočena je ranije i kod polaznog (adamant-2-il)tripeptida.⁶⁷

Zaključak

Među imunomodulatorima s potencijalnom kliničkom primjenom, muramilpeptidni adjuvanti pokazali su se odličnim kandidatima. Sintezom novih derivata MDP-a pripremljeni su spojevi s poboljšanim imunomodulacijskim svojstvima te umanjnim nuspojavama. Proučavanjem odnosa njihove strukture i aktivnosti doprinosi se razjašnjenju mehanizma imunostimulacijskog djelovanja MDP-a. Svi prikazani primjeri ukazuju da relativno male promjene u primarnoj strukturi peptidoglikanskih fragmenata utječu na imunoreakciju. Manozilacija se pokazala osobito važnom modifikacijom muramilpeptidnih i desmuramildipeptidnih adjuvanata jer se uvođenjem manoze omogućuje interakcija glikokonjugata i proteina specifičnih za manozu, čime se omogućava ciljana dostava aktivne tvari.

Popis simbola i kratica

List of symbols and abbreviations

V	– obujam – volume
w	– maseni udjel – mass fraction
CRD	– domena koja prepoznaje ugljikohidrat – carbohydrate recognition domain
DAP	– diaminopimelinska kiselina – diaminopimelic acid
DMSO	– dimetil-sulfoksid – dimethyl sulfoxide
EMA	– Europska agencija za lijekove – European Medicines Agency
FDA	– Uprava za hranu i lijekove – Food and Drug Administration
GlcNAc	– N-acetilglukozamin – N-acetylglucosamine
HPLC	– visokodjelotvorna tekućinska kromatografija – high-performance liquid chromatography
IL	– interleukin – interleukin
Man-BSA	– manoziliran goveđi serumski albumin – mannosylated bovine serum albumin
MBL, MBP, MR	– manozni receptor – mannose receptor
MDP	– muramildipeptid – muramyl dipeptide
MHC	– glavni kompleks gena tkivne podudarnosti – major histocompatibility complex
MTP-PE	– muramiltripeptid-fosfatidiletanolamin – muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine
MurNAC	– N-acetilmuraminska kiselina – N-acetylmuramic acid
OVA	– ovalbumin – ovalbumin
PAMP	– patogenima pridruženi molekularni sljedovi – pathogen-associated molecular pattern
PBMC	– mononuklearna stanice periferne krvi – peripheral blood mononuclear cell

PGM	– peptidoglikan monomer – peptidoglycan monomer
PMA	– forbol-12-miristat-13-acetat – phorbol 12-myristate 13-acetate
PRR	– receptori za prepoznavanje uzorka – pathogen (pattern) recognition receptors
SAR	– odnos strukture i aktivnosti – structure-activity relationship
TLR	– receptori <i>Toll-like</i> – Toll-like receptor

Literatura References

1. L. Szilagy, P. Pristovšek, Structural aspects of peptides with immunomodulating activity, *Mini-reviews Med. Chem.* **7** (2007) 861–870.
2. J. C. Cox, A. R. Coulter, Adjuvants – a classification and review of their modes of action, *Vaccine* **15** (1997) 248–256.
3. K. N. Masihi, Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections, *Int. J. Antimicrob. Agents* **14** (2000) 181–191.
4. R. A. Goldsby, T. J. Kindt, B. A. Osborne, J. Kuby, *Immunology*, 5. izd., W. H. Freeman and Company, New York, 2002.
5. K. D. Elgert, *Immunology: understanding the immune system*, Wiley-Liss, New York, 1996.
6. L. Habjanec, B. Halassy, J. Tomašić, *Int. Immunopharm.* **8** (2008) 717–724.
7. C. Ochi, N. Norisada, M. Moriguchi, U. Urleb, S. Muraoka, Interleukin-10 inducing activity of LK423, a phthalimido-desmuramyl dipeptide compound, *Arzneim.-Forsch/Drug Res.* **49** (1999) 72–79.
8. E. Lien, T. J. Sellati, A. Yoshimura, T. H. Flo, G. Rawadhi, R. W. Finberg, J. D. Carroll, T. Espevik, R. R. Ingalls, J. D. Radolf, D. T. Golenbock, Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products, *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 33419–33425.
9. A. Uehara, S. Yang, Y. Fujimoto, K. Fukase, S. Kusumoto, K. Shibata, S. Sugawara, H. Takada, Muramyl dipeptide and diamino pimelic acid-containing desmuramyl peptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture, *Cell. Microbiol.* **7** (2005) 53–61.
10. S. E. Girardin, L. H. Travassos, M. Herve, D. Blanot, I. G. Boneca, D. J. Philpott, P. J. Sansonetti, D. Mengin-Lecreulx, Peptidoglycan Molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 41702–41708.
11. N. Inohara, Y. Ogura, G. Nuñez, Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens, *Curr. Opin. Microbiol.* **5** (2002) 76–80.
12. P. Lefrancier, E. Lederer, Muramyl-peptides, *Pure & Appl. Chem.* **59** (1987) 449–454.
13. A. Hasegawa, Y. Kaneda, Y. Goh, K. Nishibori, M. Kiso, Synthesis of carbohydrate analogs (positional, configurational, and optical) of *N*-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-isoglutamine, and their immunoadjuvant activities, *Carbohydr. Res.* **94** (1981) 143–163.
14. T. Ogawa, S. Kotani, H. Shimauchi, Enhancement of serum antibody production in mice by oral administration of lipophilic derivatives of muramyl peptides and bacterial lipopolysaccharides with bovine serum albumin, *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **8** (1986) 117–125.
15. N. E. Byars, Two adjuvant-active muramyl dipeptide analogs induce differential production of lymphocyte-activating factor and a factor causing distress in guinea pigs, *Infect. Immun.* **44** (1984) 344–350.
16. A. C. Allison, N. E. Byars, Adjuvant formulations and their mode of action, *Semin. Immunol.* **2** (1990) 369–374.
17. G. M. Bahr, Non-specific immunotherapy of HIV-1 infection: potential use of the synthetic immunodulator murabutide, *J. Antimicrob. Chemother.* **51** (2003) 5–8.
18. I. Azuma, Development of the cytokine inducer romurtide: experimental studies and clinical application, *Trends Pharmacol. Sci.* **13** (1992) 425–428.
19. I. Azuma, Inducer of cytokines in vivo: overview of field and romurtide experience, *Int. J. Immunopharmacol.* **14** (1992) 487–496.
20. J. E. Frampton, Mifamurtide: a review of its use in the treatment of osteosarcoma, *Paediatr. Drugs* **12** (2010) 141–153.
21. P. M. Anderson, M. Tomaras, K. McConnell, Mifamurtide in osteosarcoma – a practical review, *Drugs Today* **46** (2010) 327–337.
22. D. Keglević, B. Ladešić, O. Hadžija, J. Tomašić, Z. Valinger, M. Pokorny, R. Nauminski, Isolation and study of the composition of a peptidoglycan complex excreted by the biotin-requiring mutant of *Brevibacterium divaricatum* NRRL-2311 in the presence of penicillin, *Eur. J. Biochem.* **42** (1974) 389–400.
23. M. Krstanović, R. Frkanec, B. Vranešić, Đ. Ljevaković, V. Šporec, J. Tomašić, Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of peptidoglycan monomers and structurally related peptides and adamantyltripeptides, *J. Chromatogr. B* **773** (2002) 167–174.
24. I. Hršak, J. Tomašić, M. Osmak, Immunotherapy of B-16 melanoma with peptidoglycan monomer, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **19** (1983) 681–686.
25. G. Sava, T. Giraldo, J. Tomašić, I. Hršak, Immunotherapy of Lewis lung carcinoma with hydro-soluble peptidoglycan monomer (PGM), *Cancer Immunol. Immunother.* **15** (1983) 84–86.
26. G. Sava, J. Tomašić, I. Hršak, Antitumor and antimetastatic activity of the immunoadjuvant peptidoglycan monomer PGM in mice bearing MCa mammary carcinoma, *Cancer Immunol. Immunother.* **18** (1984) 49–53.
27. I. Hršak, J. Tomašić, K. Pavelić, Z. Valinger, Stimulation of humoral immunity by peptidoglycan monomer from *Brevibacterium divaricatum*, *Z. Immun. Forsch.* **155** (1979) 312–318.
28. I. Hršak, J. Tomašić, Immunostimulatory and antimalignant activity of peptidoglycan monomer and its metabolites, *Period. Biol.* **88** (1986) 22–23.
29. J. Tomašić, I. Hršak, Peptidoglycan monomer originating from *Brevibacterium divaricatum* – its metabolites and biological activities in the host, u: E. Shrinner, M. H. Richmond, G. Seibert, G. Schwartz (ur.), *Surface structures of microorganisms and their interactions with mammalian host*, VCH, Weinheim, 1988., str. 113–121.
30. J. Tomašić, I. Hanzl-Dujmović, B. Špoljar, B. Vranešić, M. Šantak, A. Jovičić, Comparative study of the effects of peptidoglycan monomer and structurally related adamantyltripeptides on humoral immune response to ovalbumin in the mouse, *Vaccine* **18** (2000) 1236–1243.
31. B. Halassy, M. Krstanović, R. Frkanec, J. Tomašić, Adjuvant activity of peptidoglycan monomer and its metabolic products, *Vaccine* **21** (2003) 971–976.
32. Z. Valinger, B. Ladešić, J. Tomašić, Partial purification and characterization of *N*-Acetylmuramyl-L-alanine amidase from human and mouse serum, *Biochim Biophys. Acta* **701** (1982) 63–71.
33. M. Krstanović, M. Brgles, B. Halassy, R. Frkanec, A. Vrdoljak, K. Branović, F. Benedetti, J. Tomašić, Purification and characterization of L,(L/D)-aminopeptidase from guinea pig serum, *Prep. Biochem. Biotechnol.* **36** (2006) 175–195.
34. I. Hršak, Đ. Ljevaković, J. Tomašić, B. Vranešić, Preparation, properties and biological activity of *tert*-butyloxycarbonyl-L-tyrosyl peptidoglycan monomer u: N. Masihi, M. Dek-

- ker (ur.), Immunotherapy of Infections, Inc., New York, 1994., str. 249–257.
35. Đ. Ljevaković, J. Tomašić, V. Šporec, B. Halassy Špoljar, I. Hanzl-Dujmović, Synthesis of novel adamantylacetyl derivative of peptidoglycan monomer – biological evaluation of immunomodulatory peptidoglycan monomer and respective derivatives with lipophilic substituents on amino group, *Bioorg. Med. Chem.* **8** (2000) 2441–2447.
 36. K. Fehér, P. Pristovšek, L. Szilágyi, Đ. Ljevaković, J. Tomašić, Modified glycopeptides related to cell wall peptidoglycan: conformational studies by NMR and molecular modelling, *Bioorg. Med. Chem.* **11** (2003) 3133–3140.
 37. S. Gobec, U. Urleb, Synthesis of new lipophilic phosphonate and phosphoramidate analogues of *N*-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine related to LK 423, *Molecules* **7** (2002) 394–404.
 38. S. Gobec, M. Sollner-Dolenc, U. Urleb, B. Wraber, S. Simčič, M. Filipič, Modulation of cytokine production by some phthalimido-desmuramyl dipeptides and their cytotoxicity, *Il Farmaco* **59** (2004) 345–352.
 39. K. Hemmi, H. Takeno, S. Okada, O. Nakaguchi, Y. Kitaura, M. Hashimoto, Total synthesis of FK-156 isolated from a *Streptomyces* as an immunostimulating peptide: application of a novel copper chelate amino protection, *J. Am. Chem. Soc.* **103** (1981) 7026–7028.
 40. D. Migliore-Samour, J. Bouchaudon, F. Floch, A. Zerial, L. Ninet, G. H. Werner, P. A. Jolles, A short lipopeptide, representative of a new family of immunological adjuvants devoid of Sugar, *Life Sci.* **26** (1980) 883–888.
 41. M. Sollner, S. Pečar, A. Štalc, The influence of the lipophilicity of the 7-oxoacyl-L-alanyl-D-isoglutamines on their immunorestitution activity *in vivo*, *Eur. J. Med. Chem.* **31** (1996) 927–933.
 42. D. H. R. Barton, J. Camara, P. Dalko, S. D. Gero, Synthesis of biologically active carbocyclic analogues of *N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP), *J. Org. Chem.* **54** (1989) 3764–3766.
 43. D. Kikelj, S. Pečar, V. Kotnik, A. Štalc, B. Waber-Herzog, S. Simčič, A. Ihan, L. Klamfer, L. Povšič, R. Grahek, E. Suhadolc, M. Hočevar, H. Hönig, R. Rogi-Kohlenprath, *N*-{*trans*-2-[[2'-(Acetylamino)cyclohexyl]oxy]acetyl}-L-alanyl-D-glutamic Acid: a novel immunologically active carbocyclic muramyl dipeptide analogue, *J. Med. Chem.* **41** (1998) 530–539.
 44. Ž. Jakopin, E. Corsini, M. Gobec, I. Mlinarič-Raščan, M. Sollner Dolenc, Design, synthesis and biological evaluation of novel desmuramyl dipeptide analogs, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 3762–3777.
 45. M. Flegel, J. Seifert, H. Farghali, K. Masek, M. Krojido, Synthesis and pharmacological properties of adamantylamide analogs of muramyl-dipeptide u: D. Therodopoulos (ur.), *Peptides*, Walter de Gruyter and Co., Berlin, 1986, str. 561–564.
 46. P. D. Becker, M. Nörder, C. A. Guzmán, S. Grinstein, Immune modulator adamantylamide dipeptide stimulates efficient major histocompatibility complex class I-restricted responses in mice, *Clin. Vaccine Immunol.* **14** (2007) 538–543.
 47. P. D. Becker, R. S. Corral, C. A. Guzmán, S. Grinstein, Adamantylamide dipeptide as effective immunoadjuvant in rabbits and mice, *Vaccine* **19** (2001) 4603–4609.
 48. J. Turánek, D. Záluská, A. Vacek, P. Borkovcová, J. Thurnvaldová, L. Bláha, K. Mašek, Stimulation of nonspecific immunity, haemopoiesis and protection of mice against radiation injury by 1-adamantylamide-L-alanyl-D-isoglutamine incorporated in liposomes, *Int. Immunopharm.* **1** (2001) 167–175.
 49. B. Vranešić, J. Tomašić, S. Smerdel, D. Kantoci, F. Benedetti, Synthesis and antiviral activity of novel adamantylpeptides, *Helv. Chim. Acta* **76** (1993) 1752–1758.
 50. R. Ribić, L. Habjanec, B. Vranešić, R. Frkanec, S. Tomić, Synthesis and immunostimulating properties of novel adamant-1-yl tripeptides, *Chem. Biodiv.* **9** (2012) 777–788.
 51. T. Barman, *Enzyme handbook*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1969, str. 176.
 52. S. Gobec, U. Urleb, S. Simčič, B. Wraber, Synthesis and modulation of cytokine production by two new adamantane substituted acyclic desmuramyl dipeptide analogues, *Pharmazie* **56** (2001) 523–526.
 53. T. K. Lindhorst, *Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry*, 2. izd., Wiley-VCH, Weinheim 2003.
 54. M. E. Taylor, K. Drickamer, *Introduction to Glycobiology*, 2. izd, Oxford University Press Inc., New York, 2003.
 55. M. Monsigny, A.-C. Roche, P. Bailly, Tumoricidal activation of murine alveolar macrophages by muramyl dipeptide substituted mannosylated serum albumin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **121** (1984) 579–584.
 56. A. C. Roche, P. Midoux, V. Pimpaneau, E. Nègre, R. Mayer, M. Monsigny, Endocytosis mediated by monocyte and macrophage membrane lectins – application to antiviral drug targeting, *Res. Virol.* **141** (1990) 243–249.
 57. P. Opanasopit, M. Sakai, M. Nishikawa, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida, Inhibition of liver metastasis by targeting of immunomodulators using mannosylated liposome carriers, *J. Con. Rel.* **80** (2002) 283–294.
 58. S. Espuelas, C. Thumann, B. Heurtault, F. Schuber, B. Frisch, Influence of ligand valency on the targeting of immature human dendritic cells by mannosylated liposomes, *Bioconjugate Chem.* **19** (2008) 2385–2393.
 59. J.-S. Thomann, B. Heurtault, S. Weidner, M. Brayé, J. Beyrath, S. Fournel, F. Schuber, B. Frisch, Antitumor activity of liposomal ErbB2/HER2 epitope peptide-based vaccine constructs incorporating TLR agonists and mannose receptor targeting, *Biomaterials* **32** (2011) 4574–4583.
 60. R. Ribić, L. Habjanec, M. Brgles, S. Tomić, J. Tomašić, Novel mannosyl derivatives of peptidoglycan monomer: synthesis and biological evaluation of immunomodulatory properties, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009) 6096–6107.
 61. M. Chieppa, G. Bianchi, A. Doni, A. Del Prete, M. Sironi, G. Laskarin, P. Monti, L. Piemonti, A. Biondi, A. Mantovani, M. Introna, P. Allavena, Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program, *J. Immunol.* **171** (2003) 4552–4560.
 62. M. Luong, J. S. Lam, J. Chen, S. M. Lewitz, Effects of fungal *N*- and *O*-linked mannosylation on the immunogenicity of model vaccines, *Vaccine* **25** (2007) 4340–4344.
 63. R. Ribić, L. Habjanec, B. Vranešić, R. Frkanec, S. Tomić, Synthesis and biological evaluation of new mannose derived immunomodulating adamantyl tripeptides, *Croat. Chem. Acta* **84** (2011) 233–244.
 64. R. Ribić, L. Habjanec, R. Frkanec, B. Vranešić, S. Tomić, Influence of mannosylation on immunostimulating activity of adamant-1-yl tripeptide, *Chem. Biodiv.*, doi: 10.1002/cbdv.201200008
 65. A. Štimac, S. Šegota, M. Dutour Sikirić, R. Ribić, L. Frkanec, V. Svetličić, S. Tomić, B. Vranešić, R. Frkanec, Carbohydrate decorated liposomes via adamantane anchor in lipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* **1818** (2012) 2252–2259.
 66. R. Ribić, M. Kovačević, V. Petrović Peroković, I. Grujić-Sovulj, S. Tomić, V. Rapić, Synthesis and biological activity of mannose conjugates with 1-adamantamine and ferrocene amines, *Croat. Chem. Acta* **83** (2010) 421–431.
 67. R. Frkanec, V. Noethig Laslo, B. Vranešić, K. Miroslavljević, J. Tomašić, A spin labelling study of immunomodulating peptidoglycan monomer and adamantyl tripeptides entrapped into liposomes, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)* **1611** (2003) 187–196.

SUMMARY

Preparation and Immunomodulatory Properties of Modified Peptidoglycan Fragments

R. Ribić* and S. Tomić

Immunostimulators, known also as adjuvants, are added to vaccines to accelerate, extend or amplify the specific immune reaction to a specific antigen. One well known class of immunomodulating compounds is based on muramylpeptides which are fragments of peptidoglycans, natural polymers that build up the cell wall of bacteria. Muramyl dipeptide, *N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP, Fig. 1) is the smallest structural unit of the peptidoglycan monomer (PGM, Fig. 2) which shows immunostimulating activity. PGM isolated from *Brevibacterium divaricatum*, acts in itself as an effective adjuvant, and several derivatives were prepared to study the possible influence of different substituents on the immunomodulatory activity. Thus, lipophilic derivatives *tert*-butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-PGM and (adamant-1-yl)acetyl-PGM (Fig. 3) were prepared and their activities studied. They were also shown to be good substrates for *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase from human serum (Scheme 1) which specifically hydrolyzes the lactylamide bond. MDP which is an integral part of PGM and proven to be an effective adjuvant was further synthetically modified and obtained derivatives tested as possible immunomodulators. Romutide (MDP-Lys(L18)), approved by Food and Drug Administration (FDA), and mifamurtide (L-MTP-PE), approved by European Medicines Agency (EMA), highlight among many other MDP derivatives (Fig. 4). Since *N*-acetylglucosamine in the structure of MDP is not essential for the immunostimulating effect, desmuramyl dipeptides (Fig. 5) with different acyl groups at N-terminus of L-Ala-D-isoGln dipeptide were prepared. In adamantyl desmuramyl dipeptides such as adamantylamide dipeptide (Fig. 6), adamantyl tripeptides (Fig. 7) and desmuramylpeptides with (adamant-1-yl)carboxyamido group (Fig. 8), lipophilic adamantane moiety is bound to the dipeptide part. Binding of some specific sugars to immune active substances may help their targeted delivery. An example is mannose which enables mannosylated compounds to interact with lectins specific for mannose, such as mannose receptors (MR) expressed at macrophages and dendritic cells. Therefore, it is possible to increase the activity of the parent immunologically active compound by mannosylation. One of the ways is the preparation of mannosylated liposomes by using mannosylated lipids (Fig. 9). Mannosylation can also influence the direction of the immune reaction. This is shown by the examples of mannosylated PGM and adamantyl tripeptides. Mannosylated PGM derivatives (Scheme 2) are the first PGM derivatives comprising carbohydrate substituents. Mannosylation changed the immunostimulating activity of PGM, but did not affect the susceptibility of the lactylamide bond to hydrolysis with *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase (Scheme 3). Adamantyl tripeptides, structurally related to PGM, can be mannosylated using the same method (Scheme 4). The greatest potential showed the mannosylated (adamant-1-yl)tripeptide (Fig. 10) whose immunostimulating activity is comparable to that of PGM.

Numerous MDP derivatives have been synthesized with the intention of improving the pharmacological properties and reducing the side effects of the parent molecule. Furthermore, the study of their structure-activity relationship contributes to the clarification of the mechanism of action of MDP. All presented examples indicate that relatively small changes in the primary structure of peptidoglycan fragments affect their immune reaction. Mannosylation is particularly important modification of muramylpeptide adjuvants since it may allow the targeted delivery of these active substances.

Division of Organic Chemistry, Department of Chemistry,
Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a,
HR-10 000 Zagreb, Croatia

Received April 2, 2012
Accepted July 18, 2012